

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

| | |
|--|--|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 04 mai 1999 (04.05.99) | Destinataire: United States Patent and Trademark Office (Box PCT) Crystal Plaza 2 Washington, DC 20231 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE |
| Demande internationale no PCT/FR98/01757 | Référence du dossier du déposant ou du mandataire S91B1PCT |
| Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 août 1998 (06.08.98) | Date de priorité (jour/mois/année) 12 août 1997 (12.08.97) |
| Déposant CALAS, Bernard etc | |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

24 février 1999 (24.02.99)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

| | |
|--|---|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé Sean Taylor no de téléphone: (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire S91B1PCT | POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER | |
| Demande internationale n° PCT/FR 98/ 01757 | Date du dépôt international(jour/mois/année) 06/08/1998 | (Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 12/08/1997 |
| Déposant SYNT:EM (S.A.) et al. | | |

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. **Base du rapport**

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégué,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégué est la Figure n°

suggérée par le déposant.

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07K7/08 A61K38/10 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X | <p>QU, XIAO-DAN ET AL: "Protegrin structure and activity against <i>Neisseria gonorrhoeae</i>" <i>INFECT. IMMUN.</i> (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR; ISSN: 0019-9567, 1997, XP002065780 see page 638, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1; table 1 --- -/-</p> | 1-5, 16 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
| 3 May 1999 | 11/05/1999 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Fuhr, C |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01757

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X | MASUDA, MASAO ET AL: "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ('Tyr5,12, Lys7!-polyphemusin II)" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRCA9; ISSN: 0006-291X, 1992, XP002065781 See compound T10 in fig. 1 see page 848, last paragraph - page 849, paragraph 2; figure 1 --- | 1,2,16 |
| X | TAMAMURA, HIROKAZU ET AL: "Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs" CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL; ISSN: 0009-2363, 1993, XP002047195 see page 978, right-hand column, paragraph 2 - page 979, right-hand column, paragraph 1; figure 1 --- | 1,2,16 |
| X | WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I ;UNIV CALIFORNIA (US)) 29 May 1997 See compound PC-8 see claims; example 12; table 17 --- | 1-5,16 |
| A | WO 94 18323 A (XOMA CORP) 18 August 1994 see page 3, line 12 - page 4, line 26 --- | 1-6,16 |
| A | WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) 3 May 1990 see claims; examples --- | 1-7,16 |
| X | WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 November 1996 see page 20, line 34 - page 22, line 41; claims 4,6,7,12 see page 28, line 27 - page 30, line 15 --- | 1-5 |
| X | WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 June 1995 voir SeqID No. 5, page 29 see page 14, line 34 - page 16, line 21; claims; examples ----- | 1-5 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/FR 98/01757

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---------------|---------------|------------------|
| WO 9718826 | A 29-05-1997 | AU 1162997 A | AU 7739496 A | CA 2238429 A | 11-06-1997 |
| | | CZ 9801591 A | CZ 9801592 A | EP 0862448 A | 29-05-1997 |
| | | EP 0865292 A | NO 982310 A | NO 982311 A | 14-10-1998 |
| | | PL 326924 A | WO 9718827 A | PL 326924 A | 16-12-1998 |
| | | WO 9718827 A | | WO 9718827 A | 09-09-1998 |
| | | | | WO 9718827 A | 23-09-1998 |
| | | | | WO 9718827 A | 09-11-1998 |
| | | | | WO 9718827 A | 29-05-1997 |
| ----- | | | | | |
| WO 9418323 | A 18-08-1994 | US 5420019 A | AU 693089 B | AU 6170294 A | 30-05-1995 |
| | | CN 1120352 A | EP 0689592 A | FI 953658 A | 25-06-1998 |
| | | JP 8506586 T | JP 8506586 T | JP 8506586 T | 29-08-1994 |
| | | NO 953033 A | NO 953033 A | NO 953033 A | 10-04-1996 |
| | | NZ 262284 A | US 5674834 A | US 5674834 A | 03-01-1996 |
| | | US 5827816 A | US 5827816 A | US 5827816 A | 07-10-1997 |
| | | ZA 9400703 A | ZA 9400703 A | ZA 9400703 A | 27-10-1998 |
| | | | | | 05-09-1994 |
| ----- | | | | | |
| WO 9004408 | A 03-05-1990 | AT 107170 T | AU 641129 B | AU 4502889 A | 15-07-1994 |
| | | CA 2001150 A | CA 1043263 A | CA 1043263 A | 16-09-1993 |
| | | CN 68916261 D | DE 68916261 D | DE 68916261 D | 14-05-1990 |
| | | DE 68916261 T | DK 71591 A | DK 71591 A | 21-04-1990 |
| | | EP 0441832 A | EP 0441832 A | EP 0441832 A | 27-06-1990 |
| | | IL 92061 A | IL 92061 A | IL 92061 A | 21-07-1994 |
| | | JP 4502904 T | JP 4502904 T | JP 4502904 T | 22-09-1994 |
| | | PT 92078 A | PT 92078 A | PT 92078 A | 25-01-1994 |
| | | US 5217956 A | US 5217956 A | US 5217956 A | 28-05-1992 |
| | | GR 1000913 B | GR 1000913 B | GR 1000913 B | 30-04-1990 |
| | | | | | 08-06-1993 |
| | | | | | 16-03-1993 |
| ----- | | | | | |
| WO 9637508 | A 28-11-1996 | US 5804558 A | AU 5874996 A | CA 2222475 A | 08-09-1998 |
| | | EP 0871654 A | EP 0871654 A | EP 0871654 A | 11-12-1996 |
| | | | | | 28-11-1996 |
| | | | | | 21-10-1998 |
| ----- | | | | | |
| WO 9516776 | A 22-06-1995 | US 5580852 A | AU 2287095 A | CA 2179301 A | 03-12-1995 |
| | | EP 0734441 A | EP 0734441 A | EP 0734441 A | 03-07-1995 |
| | | | | | 22-06-1995 |
| | | | | | 02-10-1996 |
| | | | | | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 98/01757

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K7/08 A61K38/10 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | QU, XIAO-DAN ET AL: "Protegrin structure and activity against <i>Neisseria gonorrhoeae</i> " INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR; ISSN: 0019-9567, 1997, XP002065780 voir page 638, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1; tableau 1 --- | 1-5, 16 |
| X | MASUDA, MASAO ET AL: "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ('Tyr5,12, Lys7!-polyphemusin II)" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRCA9; ISSN: 0006-291X, 1992, XP002065781 * voir composé T10 en fig. 1 * voir page 848, dernier alinéa - page 849, alinéa 2; figure 1 --- | 1, 2, 16 |



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mai 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/05/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | TAMAMURA, HIROKAZU ET AL: "Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs" CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL; ISSN: 0009-2363, 1993, XP002047195 voir page 978, colonne de droite, alinéa 2 - page 979, colonne de droite, alinéa 1; figure 1 --- X WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I ;UNIV CALIFORNIA (US)) 29 mai 1997 * voir composé PC-8 * voir revendications; exemple 12; tableau 17 --- | 1, 2, 16 1-5, 16 |
| A | WO 94 18323 A (XOMA CORP) 18 aout 1994 voir page 3, ligne 12 - page 4, ligne 26 --- | 1-6, 16 |
| A | WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) 3 mai 1990 voir revendications; exemples --- | 1-7, 16 |
| X | WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 novembre 1996 voir page 20, ligne 34 - page 22, ligne 41; revendications 4,6,7,12 voir page 28, ligne 27 - page 30, ligne 15 --- | 1-5 |
| X | WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 juin 1995 voir SeqID No. 5, page 29 voir page 14, ligne 34 - page 16, ligne 21; revendications; exemples ----- | 1-5 |

29 OCT. 1998

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

**NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT**

(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

| | |
|---|--|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 22 octobre 1998 (22.10.98) | NOTIFICATION IMPORTANTE |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire S91B1PCT | Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 août 1998 (06.08.98) |
| Demande internationale no PCT/FR98/01757 | |

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

le déposant l'inventeur le mandataire le représentant commun

| | | |
|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| Nom et adresse CHAVANIEU, Alain 3, rue Saint-Denis F-34820 Assas FRANCE | Nationalité (nom de l'Etat) FR | Domicile (nom de l'Etat) FR |
| | no de téléphone | |
| | no de télécopieur | |
| | no de télécopieur | |

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

la personne le nom l'adresse la nationalité le domicile

| | | |
|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| Nom et adresse CHAVANIEU, Alain 680, ch. des bausquets F-34820 Assas FRANCE | Nationalité (nom de l'Etat) FR | Domicile (nom de l'Etat) FR |
| | no de téléphone | |
| | no de télécopieur | |
| | no de télécopieur | |

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

| | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur | <input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés |
| <input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale | <input type="checkbox"/> aux offices élus concernés |
| <input type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international | <input type="checkbox"/> autre destinataire: |

| | |
|---|--|
| Bureau international de l'OMPI 34, ch min des Col mbettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé: Maria Kirchner no de téléphone (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)
22 septembre 1998 (22.09.98)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
S91B1PCT

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no
PCT/FR98/01757

Date du dépôt international (jour/mois/année)
06 août 1998 (06.08.98)

Date de publication internationale (jour/mois/année)
Pas encore publiée

Date de priorité (jour/mois/année)
12 août 1997 (12.08.97)

Déposant

SYNT:EM (S.A.) etc

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1:a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Date de priorité

Demande de priorité n°

Pays, office régional ou
office récepteur selon le PCT

Date de réception du
document de priorité

12 août 1997 (12.08.97) 97/10297

FR

21 sept 1998 (21.09.98)

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Marie-José Devillard

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

26 FEB 1999

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

| | | |
|---|--|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 18 février 1999 (18.02.99) | | |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire S91B1PCT | | AVIS IMPORTANT |
| Demande internationale no PCT/FR98/01757 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 août 1998 (06.08.98) | Date de priorité (jour/mois/année) 12 août 1997 (12.08.97) |
| Déposant SYNT:EM (S.A.) etc | | |

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU, BR, CN, EP, IL, JP, KP, KR, US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BY, CA, CH, CU, CZ, DE, DK, EA, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 18 février 1999 (18.02.99) sous le numéro WO 99/07728

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

| | |
|---|---|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38 |
|---|---|

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

1999

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGEÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

BREESE, Pierre
BREESE - MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL (règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année)

07.10.99

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
S91B1PCT

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR98/01757

Date du dépôt international (jour/mois/année)
06/08/1998

Date de priorité (jour/mois/année)
12/08/1997

Déposant

SYNT:EM (S.A.) et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international

Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Gallego, A

Tél. +49 89 2399-8102



10
T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference S91B1PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/FR98/01757 | International filing date (day/month/year) 06 August 1998 (06.08.98) | Priority date (day/month/year) 12 August 1997 (12.08.97) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 7/08 | | |
| Applicant SYNT:EM (S.A.) | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

| | |
|---|---|
| Date of submission of the demand 24 February 1999 (24.02.99) | Date of completion of this report 07 October 1999 (07.10.1999) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/01757

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-25, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____,

pages _____, filed with the letter of _____.

the claims, Nos. 1-17, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. _____, filed with the letter of _____,

Nos. _____, filed with the letter of _____.

the drawings, sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____

the claims, Nos. _____

the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/01757

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 6-17 | YES |
| | Claims | 1-5 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 6-17 | YES |
| | Claims | 1-5 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-17 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: QU, XIAO-DAN ET AL.: "Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*"; INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR; ISSN: 0019-9567, 1997,

D2: MASUDA, MASAO ET AL.: "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12, Lys7-polyphemusin II]"; BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRCA9; ISSN: 0006-291X, 1992,

D3: TAMAMURA, HIROKAZU ET AL.: "Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs" CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL; ISSN: 0009-2363, 1993,

D4: WO 97/18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I; UNIV CALIFORNIA (US)) 29 May 1997,

D5: WO 94/18323 A (XOMA CORP), 18 August 1994,

D6: WO 96/37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES), 28 November 1996,

D7: WO 95/16776 A (PIONEER HI BRED INT), 22 June 1995,

D8: WO 90/04408 A (MAGANIN SCIENCES INC), 3 May 1990,

2. D1 discloses the peptide "PC-8" (see tables, page 637, and page 638, left-hand column, penultimate paragraph, lines 1 and 2). PC-8 is a peptide derived from an antibiotic peptide, free of disulphide bonds, which corresponds to formula (I) of Claim 3. Its antibiotic potential was proved in D1. For this reason the subject matter of Claims 1-5 is not novel (PCT Article 33(2)).
3. D2 describes peptide T10 (see Figure 1) which is included in the subject matter of Claims 1 and 2. The subject matter of Claims 1 and 2 is therefore not novel (PCT Article 33(2)).
4. D3 describes peptides 4-Ala-T-I and 4Cys(Acm)-T-I (see Figure 1) which are included in the subject matter of Claims 1 and 2. The subject matter of Claims 1 and 2 is therefore not novel (PCT Article 33(2)).
5. D4 describes the antibiotic peptide PC-8 (see page 75, Table 17, and line 29) which is incorporated in the subject matter of Claims 1-5. The subject matter of these claims is therefore not novel (PCT Article 33(2)).
6. D5 describes polypeptides (see, for example, sequence id. 1 and 2) which have antibiotic activity and which are, at the same time, described as being free of disulphide bonds (even if they do comprise Cys). The subject of Claim 1 is therefore not novel

(PCT Article 33(2)).

7. D6 discloses peptides with antibiotic activity which are, at the same time, described as being free of disulphide bonds (even if they do comprise Cys. See, for example, page 18, line 8, to page 20, line 22). The subject of Claim 1 is therefore not novel (PCT Article 33(2)).

At the same time D6 describes peptides with antibiotic activity characterised in that all except one of the Cys residues are replaced by another amino acid residues (see page 19, lines 35 and 38; page 20, lines 4, 6, 13, 14 and 15). The subject matter of Claims 1 and 2 is therefore not novel (PCT Article 33(2)).

D6 also describes peptides with antibiotic activity characterised in that all of the Cys radicals are replaced by another amino acid radical (see page 22, lines 33 to 37). The subject matter of Claims 1-5 is therefore not novel (PCT Article 33(2)).

8. D7 describes peptides indicated by Sequence ID. 1-3, 5-15 and 18-21 (see pages 28-36) which have antibiotic activity, characterised in that all of the Cys residues are replaced with another amino acid residue. The subject matter of Claims 1-5 is therefore not novel (PCT Article 33(2)).

9. D8 describes peptides I to V (see pages 8 and 9) and (1) to (8) (see page 17) which are free of disulphide bonds and have antibiotic activity. The subject matter of Claims 1-5 is therefore not novel (PCT Article 33(2)). D8 describes that the amphipatic peptides forming pores in the membrane of pathogenic cells can be combined with toxic ions so

as to increase the antibiotic activity of these peptides.

10. The applicants found that linear tachyplesin and protegrin derivatives, in which the Cys are replaced by various natural amino acids, are non-toxic and have no lytic activity, but are able to cross mammal cell membranes at speed by a passive mechanism. They can thus be a vector system for active ingredients.

Such an activity is not described in the prior art according to the International Search Report. For this reason, the subject matter of the present application which is not yet disclosed in this prior art (see paragraphs 1-8) appears to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1 (a) (ii), the description does not outline the relevant prior art disclosed in documents D1-D6 and D8 and does not cite these documents.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

| | | | |
|--|---|--|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire S91B1PCT | POUR SUITE A DONNER | | voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) |
| Demande internationale n° PCT/FR98/01757 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/08/1998 | Date de priorité (jour/mois/année) 12/08/1997 | |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K7/08 | | | |
| Déposant SYNT:EM (S.A.) et al. | | | |
| <p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p> | | | |
| <p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale | | | |

| | |
|---|---|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 24/02/1999 | Date d'achèvement du présent rapport 07.10.99 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 eprmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Fonctionnaire autorisé G. Willière N° de téléphone +49 89 2399 8548 |



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR98/01757

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.) :

Description, pages:

1-25 version initiale

Revendications, N°:

1-17 version initiale

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

de la description. pages :

des revendications, n°s :

3. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4 Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/01757

V. Déclarations relatives à l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

| | |
|--|---------------------------|
| Nouveauté | Oui : Revendications 6-17 |
| | Non : Revendications 1-5 |
| Activité inventive | Oui : Revendications 6-17 |
| | Non : Revendications 1-5 |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications 1-17 |
| | Non : Revendications |

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

voir feuille séparée

Concernant le point V

1. Il est fait référence aux documents suivants:

D1: QU, XIAO-DAN ET AL: 'Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*' INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR;ISSN: 0019-9567,1997,
D2: MASUDA, MASAO ET AL: 'A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusin II)' BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRCA9;ISSN: 0006-291X,1992,
D3: TAMAMURA, HIROKAZU ET AL: 'Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs' CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL;ISSN: 0009-2363,1993,
D4: WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I ;UNIV CALIFORNIA (US)) 29 mai 1997
D5: WO 94 18323 A (XOMA CORP) 18 août 1994
D6: WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 novembre 1996
D7: WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 juin 1995
D8: WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) 3 mai 1990

2. D1 divulgue le peptide "PC-8" (voir page 637 tableaux et page 638, colonne de gauche, avant-dernier paragraphe, lignes 1 et 2). PC-8 est un peptide dérivé d'un peptide antibiotique dépourvu de pont disulfure, correspondant à la formule (I) selon la revendication 3. Le potentiel antibiotique a été vérifié dans D1. C'est pourquoi l'objet des revendications 1-5 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT).

3. D2 décrit le peptide T10 (voir figure 1) qui est compris dans l'objet des revendications 1 et 2. L'objet des revendications 1 et 2 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

4. D3 décrit les peptides 4-Ala-T-I et 4Cys(Acm)-T-I (voir figure 1) qui sont compris dans l'objet des revendications 1 et 2. L'objet des revendications 1 et 2 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

5. D4 décrit le peptide antibiotique PC-8 (voir page 75, tableau 17 et ligne 29) qui est compris dans l'objet des revendications 1 à 5. L'objet de ces revendications n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).
6. D5 décrit des polypeptides (voir p. ex. seq. id. 1 et 2) qui ont une activité antibiotique et qui en même temps sont décrits d'être dépourvu de pont disulfure (même si ils comprennent des Cys). L'objet de la revendication 1 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).
7. D6 divulgue des peptides ayant une activité antibiotique et qui en même temps sont décrits d'être dépourvu de pont disulfure (même si ils comprennent des Cys) (voir p.ex. page 18, ligne 8 à la page 20, ligne 22). L'objet de la revendication 1 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

En même temps D6 décrits des peptides ayant une activité antibiotique caractérisés en ce que tous les résidues Cys, sauf un, sont remplacés par un autre résidu d'acide aminé (voir page 19, lignes 35 et 38, page 20, lignes 4, 6, 13, 14 et 15). L'objet des revendications 1 et 2 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

D6 décrit aussi des peptides ayant une activité antibiotique caractérisés en ce que tous les résidues Cys sont remplacés par un autre résidu d'acide aminé (voir page 22, lignes 33 à 37). L'objet des revendications 1 à 5 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

8. D7 décrit les peptides ayant les seq.id. 1-3, 5 à 15 et 18 à 21 (voir pages 28 à 36) ayant une activité antibiotique caractérisé en ce que tous les résidues Cys sont remplacés par un autre résidu d'acide aminé. L'objet des revendications 1 à 5 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).
9. D8 décrit les peptides I à V (voir pages 8 et 9) et (1) à(8) (voir page 17) dépourvu de pont disulfure et ayant une activité antibiotique . L'objet des revendications 1 à 5 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT). Autrement D8 décrit que les peptides amphipatiques formant des pores dans la membrane de cellules pathogènes peuvent être combinés avec des ions toxique a fin d'augmenter

l'action antibiotique de ces peptides.

10. La demanderesse a trouvé que les dérivés linéaires des protégrines et des tachyplésines dans lesquels les Cys sont remplacés par divers acides aminés naturels sont non-toxiques et n'ont pas d'activité lytique, mais sont capables de traverser rapidement les membranes des cellules mammifères par un mécanisme passif. Ils peuvent ainsi constituer un système de vectorisation de substances actives.

Une telle activité n'est pas décrit dans l'art antérieur selon le rapport de recherche internationale. C'est pourquoi que l'objet de la présente demande qui n'est pas encore divulgué dans cet art antérieur (voir paragraphes 1 à 8) semble impliquer une activité inventive (article 33(3) PCT).

Concernant le point VII

1. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 à D6 et D8 et ne cite pas ces documents.

197

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

11 OCT 1999

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire S91B1PCT | POUR SUITE A DONNER | voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) |
| Demande internationale n° PCT/FR98/01757 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/08/1998 | Date de priorité (jour/mois/année) 12/08/1997 |
| <p>Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K7/08</p> | | |
| <p>Déposant SYNT:EM (S.A.) et al.</p> | | |
| <p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites aupr` s de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p> | | |
| <p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale | | |

| | |
|--|--|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 24/02/1999 | Date d'achèvement du présent rapport 07.10.99 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Fonctionnaire autorisé G. Willièr N° de téléphone +49 89 2399 8548 |



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR98/01757

i. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initiallement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-25 version initiale

Revendications, N°:

1-17 version initiale

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

3. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/01757

V. Déclaration motivé selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

| | |
|--|---------------------------|
| Nouveauté | Oui : Revendications 6-17 |
| | Non : Revendications 1-5 |
| Activité inventive | Oui : Revendications 6-17 |
| | Non : Revendications 1-5 |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications 1-17 |
| | Non : Revendications |

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

voir feuille séparée

Concernant le point V

1. Il est fait référence aux documents suivants:

D1: QU, XIAO-DAN ET AL: 'Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*' INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODEN: INFIBR;ISSN: 0019-9567,1997,

D2: MASUDA, MASAO ET AL: 'A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusin II)' BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODEN: BBRCA9;ISSN: 0006-291X,1992,

D3: TAMAMURA, HIROKAZU ET AL: 'Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs' CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODEN: CPBTAL;ISSN: 0009-2363,1993,

D4: WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I ;UNIV CALIFORNIA (US)) 29 mai 1997

D5: WO 94 18323 A (XOMA CORP) 18 août 1994

D6: WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 novembre 1996

D7: WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 juin 1995

D8: WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) 3 mai 1990

2. D1 divulgue le peptide "PC-8" (voir page 637 tableaux et page 638, colonne de gauche, avant-dernier paragraphe, lignes 1 et 2). PC-8 est un peptide dérivé d'un peptide antibiotique dépourvu de pont disulfure, correspondant à la formule (I) selon la revendication 3. Le potentiel antibiotique a été vérifié dans D1. C'est pourquoi l'objet des revendications 1-5 n'est pas nouveau (article 33(2) PCT).

3. D2 décrit le peptide T10 (voir figure 1) qui est compris dans l'objet des revendications 1 et 2. L'objet des revendications 1 et 2 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

4. D3 décrit les peptides 4-Ala-T-I et 4Cys(Acm)-T-I (voir figure 1) qui sont compris dans l'objet des revendications 1 et 2. L'objet des revendications 1 et 2 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

5. D4 décrit le peptide antibiotique PC-8 (voir page 75, tableau 17 et ligne 29) qui est compris dans l'objet des revendications 1 à 5. L'objet de ces revendications n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).
6. D5 décrit des polypeptides (voir p. ex. seq. id. 1 et 2) qui ont une activité antibiotique et qui en même temps sont décrits d'être dépourvu de pont disulfure (même si ils comprennent des Cys). L'objet de la revendication 1 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).
7. D6 divulgue des peptides ayant une activité antibiotique et qui en même temps sont décrits d'être dépourvu de pont disulfure (même si ils comprennent des Cys) (voir p.ex. page 18, ligne 8 à la page 20, ligne 22). L'objet de la revendication 1 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

En même temps D6 décrit des peptides ayant une activité antibiotique caractérisés en ce que tous les résidues Cys, sauf un, sont remplacés par un autre résidu d'acide aminé (voir page 19, lignes 35 et 38, page 20, lignes 4, 6, 13, 14 et 15). L'objet des revendications 1 et 2 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

D6 décrit aussi des peptides ayant une activité antibiotique caractérisés en ce que tous les résidues Cys sont remplacés par un autre résidu d'acide aminé (voir page 22, lignes 33 à 37). L'objet des revendications 1 à 5 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).

8. D7 décrit les peptides ayant les seq.id. 1-3, 5 à 15 et 18 à 21 (voir pages 28 à 36) ayant une activité antibiotique caractérisé en ce que tous les résidues Cys sont remplacés par un autre résidu d'acide aminé. L'objet des revendications 1 à 5 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT).
9. D8 décrit les peptides I à V (voir pages 8 et 9) et (1) à(8) (voir page 17) dépourvu de pont disulfure et ayant une activité antibiotique . L'objet des revendications 1 à 5 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT). Autrement D8 décrit que les peptides amphipatiques formant des pores dans la membrane de cellules pathogènes peuvent être combinés avec des ions toxique a fin d'augmenter

l'action antibiotique de ces peptides.

10. La demanderesse a trouvé que les dérivés linéaires des protégrines et des tachyplésines dans lesquels les Cys sont remplacés par divers acides aminés naturels sont non-toxiques et n'ont pas d'activité lytique, mais sont capables de traverser rapidement les membranes des cellules mammifères par un mécanisme passif. Ils peuvent ainsi constituer un système de vectorisation de substances actives.

Une telle activité n'est pas décrit dans l'art antérieur selon le rapport de recherche internationale. C'est pourquoi que l'objet de la présente demande qui n'est pas encore divulgué dans cet art antérieur (voir paragraphes 1 à 8) semble impliquer une activité inventive (article 33(3) PCT).

Concernant le point VII

1. Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 à D6 et D8 et ne cite pas ces documents.

CRIMSON LANGUAGE SERVICES
“Expertise in Patent Translation”

258 Harvard Street • Suite 305 • Brookline • MA 02446 • Tel: 617.731.6920 or 800.798.9673 • Fax: 800.728.9673

CERTIFICATION OF VALIDATION

DECLARATION

I, Ariane Duffy, French Translator of Crimson Language Services Inc., do hereby declare that I am conversant with the French and English languages and am a competent translator thereof. I declare further that to the best of my knowledge and belief, the attached document, having been translated from French into English, is a true and correct translation validated by me.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true.

Signed this 10th day of February, 2000

x Ariane Duffy

Mintz, Levin et al. Ref. No: 19904-009; BREESE-9
Breese Majerowicz Ref. No: S091B1PCT/US

Published

With the international research report.

Before expiration of the deadline for claim modification, shall be republished if such modifications are received.

[OCT. 29 1998]

PATENT COOPERATION TREATY

PCT Sender: INTERNATIONAL OFFICE
Addressee: BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

NOTICE OF THE REGISTRATION OF A CHANGE (PCT regulation 92bis.1 and administrative instruction 422)

Mailing date (day/month/year)
October 22, 1998 (10/22/98)

Reference of applicant or agent file
S91B1PCT **IMPORTANT NOTICE**

International application no. International filing date (day/month/year)
PCT/FR98/01757 August 6, 1998 (08/06/98)

1. The following information was recorded concerning the
 applicant inventor agent common representative

| | | |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Name and address: | Nationality (name of nation) | Place of residence (name of nation) |
| Chavanieu, Alain | FR | FR |
| 3, rue Saint-Denis | Telephone number | |
| F-34820 Assas | Facsimile number | |
| FRANCE | Teleprinter number | |

2. The international office notifies the applicant that the change indicated below was recorded concerning the:
 person name address nationality place of residence

| | | |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Name and address: | Nationality (name of nation) | Place of residence (name of nation) |
| Chavanieu, Alain | FR | FR |
| 680, ch. des bausquets | Telephone number | |
| F-34820 Assas | Facsimile number | |
| FRANCE | Teleprinter number | |

3. Additional observations, if applicable:

4. A copy of this notice was sent:
 to the receiving office to the designated offices concerned
 to the administration in charge of international research to the elected offices concerned
 to the administration in charge of the international preliminary examination other addressee

OMPI International Office Authorized public official
34, chemin des Colombettes Maria Kirchner
1211 Geneva 20, Switzerland [sig.]
Facsimile no.: (41-22) 740.14.35 Telephone no. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

Sender: INTERNATIONAL OFFICE
PCT Addressee: BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

NOTICE RELATIVE TO THE PRESENTATION OR TRANSMISSION OF PRIORITY DOCUMENT (PCT administrative instruction 411)

Mailing date (day/month/year)
September 22, 1998 (09/22/98)

Reference of applicant or agent file
S91B1PCT

IMPORTANT NOTICE

International application no. PCT/FR98/01757 International filing date (day/month/year)
August 6, 1998 (08/06/98)

International publication date (day/month/year)
Not yet published Priority date (day/month/year)
August 12, 1997 (08/12/97)

Applicant:
SYNT:EM (S.A.) etc.

1. The applicant is notified by the International Office of the date of receipt (unless the letters "NR" appear in the right column) of the priority document(s) corresponding to the application(s) listed below. Excluding an indication to the contrary consisting of an asterisk appearing next to the date of receipt, or the letters "NR", in the right column, the priority document in question was given or sent to the International office in compliance with regulation 17.1.a) or b).
2. This form updates and replaces all notification relative to the presentation or transmission of the priority document previously sent.
3. An asterisk (*) appearing beside a date of receipt in the right column indicates a priority document given or sent to the International office, but not in compliance with regulation 17.1.a) or b). In this case, the applicant is advised of regulation 17.1.c) according to which no designated office can decide not to take the priority claim into account without having permitted the applicant to submit the priority document within a reasonable period of time in this case.
4. The letters "NR" appearing in the right column indicate a priority document that the International office has not received or one that the applicant has not requested the receiving office to prepare and transmit to the International office, in compliance with regulation 17.1.a) or b), respectively. In this case, the applicant is advised of regulation 17.1.c) according to which no designated office can decide not to take the priority claim into account without having permitted the applicant to submit the priority document within a reasonable period of time in this case.

| <u>Priority date</u> | <u>Priority application</u> | <u>Country, regional office or receiving office according to PCT</u> | <u>Priority document date of receipt</u> |
|--|-----------------------------|---|--|
| August 12, 1997 (08.12.97) | 97/10297 | FR | Sept. 21, 1998 (09/21/98) |
| OMPI International Office 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile no.: (41-22) 740.14.35 | | Authorized public official Marie-José Devillard [sig.] Telephone no. (41-22) 338.83.38 | |

Mintz, Levin et al. Ref. No: 19904-009; BREESE-9
Breese Majerowicz Ref. No: S091B1PCT/US

PATENT COOPERATION TREATY

PCT Sender: INTERNATIONAL OFFICE
Addressee: BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE TRANSMISSION OF THE
INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT regulation 47.1.c), first phase

Mailing date (day/month/year)
February 18, 1999 (02/18/99)

Reference of applicant or agent file
S91B1PCT

IMPORTANT NOTICE

| | | |
|-------------------------------|--|--------------------------------|
| International application no. | International filing date (day/month/year) | Priority date (day/month/year) |
| PCT/FR98/01757 | August 6, 1998 (08/06/98) | August 12, 1997 (08/12/97) |

Applicant:
SYNT:EM (S.A.) etc.

1. The present document indicates that on the date indicated above as the mailing date of this notice, the International office sent the international application, in accordance with article 20, to the following designated offices:
AU, BR, CN, EP, IL, JP, KP, KR, US

In accordance with the third sentence of regulation 47.1.c), these offices accept the present notice as determining proof of the fact that communication of the international application did indeed take place on the mailing date indicated above, and that the applicant is not required to submit a copy of the international application to the designated office(s).

2. The following designated offices waived the requirement according to which this communication must occur on this date:
AL, AM, AP, AT, AZ, BA, BB, BG, BY, CA, CH, CU, CZ, DE, DK, EA, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

The communication shall occur only upon the request of these offices. In addition, the applicant is not required to submit a copy of the international application to the offices in question (regulation 49.1)a-bis)).

3. The present notice is accompanied by a copy of the international application published by the International office on February 18, 1999 (02/18/99) under no. WO 99/07728.

NOTICE CONCERNING CHAPTER II (article 31.2)a and regulation 54.2)

If the applicant wishes to postpone the opening of the national phase until 30 months (or more for certain offices) commencing upon the date of priority, the **demand for international preliminary examination** must be presented to the competent administration in charge of the international preliminary examination before the end of a period of 19 months commencing upon the date of priority.

It is the sole responsibility of the applicant to adhere to the deadline of 19 months.

It should be noted that only an applicant who is from a contracting nation of the PCT bound by chapter II or whose place of residence is there can present a demand for international preliminary examination.

NOTICE CONCERNING OPENING OF THE NATIONAL PHASE (article 22 or 39.1)

If the applicant desires that the international application proceed to the national phase, he must perform the acts mentioned in these provisions for each designated or elected office within a period of 20 months or 30 months, or more for certain offices.

For other important information concerning the deadlines and acts to be completed for the opening of the national phase, see the appendix to form PCT/IB/301 (Notice of receipt of the original copy) and volume II of the PCT Applicant's Guide.

| | |
|--|---|
| OMPI International Office 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile no.: (41-22) 740.14.35 | Authorized public official J. Zahra Telephone no. (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

Mintz, Levin et al. Ref. No: 19904-009; BREESE-9
Breese Majerowicz Ref. No: S091B1PCT/US

PATENT COOPERATION TREATY

Sender: ADMINISTRATION IN CHARGE OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Addressee:

Breese, Pierre
Breese-Majerowicz
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMISSION OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION
REPORT
(PCT Regulation 71.1)

Mailing date (day/month/year) 10/07/99

Reference of applicant or agent file
S91B1PCT

IMPORTANT NOTICE

International application no. International filing date (day/month/year)
PCT/FR98/01757 (08/06/98) Date of priority (day/month/year)
08/12/1997

Applicant:
SYNT:EM (S.A.) et al.

1. The applicant is hereby notified that the administration in charge of the preliminary international examination drafted the preliminary international examination report for the international application and transmits it to him enclosed, accompanied, if applicable, by these appendices.

2. A copy of the present report and these appendices, if applicable, will be sent to the International office to be distributed to all the elected offices.

3. If required by one or another of the elected offices, the International office will have the report translated into English (excluding its appendices) and will send it to the offices concerned.

4. REMINDER

To begin the national phase with each elected office, the applicant must perform certain acts (deposit of a translation and payment of national taxes) within a period of 30 months starting from the date of priority (or later for certain offices) (article 39.1) (see also the reminder sent by the International office in form PCT/IB/301).

When a translation of the international application must be sent to an elected office, it must include the translation of all appendices of the preliminary international examination report. It is the responsibility of the applicant to provide the translation in question and have it sent directly to each elected office concerned.

For more information concerning the applicable deadlines and requirements of elected offices, see Volume II of the PCT applicant guide.

| | |
|--|--|
| Name and mailing address of the administration in charge of the preliminary international examination | Authorized public official |
| European Patent Office D-80298 Munich Tel: +49 89 2399 – 0 Telex: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 – 4465 | Gallego, A [Seal] Tel: +49 89 2399-8102 |

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

PRELIMINARY INTERNATIONAL EXAMINATION REPORT (PCT article 36 and regulation 70)

Reference of applicant or agent file

S91B1PCT

FOR FOLLOW-UP

see notice of transmission of the preliminary
international examination report (form PCT/IPEA/416)

International application no. International filing date (day/month/year)
PCT/FR98/01757 08/06/1998

Date of priority (day/month/year)
08/12/1997

International patent classification (CIB) or national and CIB classification
C07K7/08

Applicant:
SYNT:EM (S.A.) et al.

1. The present preliminary international examination report drafted by the administration in charge of the preliminary international examination is sent to the applicant in compliance with article 36.

2. This REPORT is comprised of 6 sheets, including the present cover sheet.

— It is accompanied by APPENDICES, or sheets of description, claims or drawings which were modified and serve as the basis for the present report or sheets containing rectifications made with the administration in charge of the preliminary international examination (see regulation 70.16 and instruction 607 of the PCT administrative instructions).

These appendices include pages.

3. The present report contains indications relative to the following points:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Absence of formulation of opinion relative to novelty, inventive activity and possibility of industrial application.
- IV Lack of unity of the invention
- V Declaration justified according to article 35(2) relative to the novelty, inventive activity and possibility for industrial application; citations and explanations supporting this statement
- VI Certain cited documents
- VII Irregularities in the international application
- VIII Observations relative to the international application

Date of presentation of the demand for preliminary international examination Date of completion of the present report

02/24/1999 10/07/99

Name and mailing address of the administration in charge of the preliminary international examination: Authorized public official

European Patent Office

D-80298 Munich

Tel: +49 89 2399 - 0 Telex: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 4465

G. Willière

Tel: +49 89 2399-8548

**PRELIMINARY INTERNATIONAL
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT/FR98/01757

I. Basis of report

1. This report was drafted based upon the following elements (*replacement sheets which were given to the receiving office in response to an invitation made in compliance with article 14 are considered, in the present report, as "initially deposited" and are not attached as an appendix to the report since they do not contain any modifications*):

Description, pages:

1-25 initial version

Claims, no. :

1-17 initial version

Drawings, pages:

1/5-5/5 initial version

2. The modifications led to cancellation of the:

- description, pages:
- claims, nos.:
- drawings, sheets:

3. — The present report was drafted without regard to (certain) modifications, which were considered as going beyond disclosure of the invention as deposited, as indicated below (regulation 70.2(c)):

4. Additional observations, if applicable:

**PRELIMINARY INTERNATIONAL
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT/FR98/01757

V. Declaration justified in accordance with article 35(2) relative to the novelty, inventive activity and possibility for industrial application; citations and explanations supporting this declaration

1. Declaration

| | |
|--|------------------|
| Novelty | Yes: Claims 6-17 |
| | No: Claims 1-5 |
| Inventive activity | Yes: Claims 6-17 |
| | No: Claims 1-5 |
| Possibility for industrial application | Yes: Claims 1-17 |
| | No: Claims |

2. Citations and explanations

see separate sheet

VII. Irregularities in the international application

The following irregularities concerning the form or content of the international application were noted:

see separate sheet

PRELIMINARY INTERNATIONAL EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET International application no. PCT/FR98/01757

Concerning Point V

1. Reference is made to the following documents:

- D1: Qu, Xiao-Dan et al: "Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoea*" INFECT. IMMUN. (1997), 65(2), 636-639 CODES: INFIBR;ISSN: 0019-9567, 1997,
- D2: Masuda, Masao et al: "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusin II)" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1992), 189(2), 845-50 CODES: BBRCA9; ISSN: 0006-291X, 1992,
- D3: Tamamura, Hirokazu et al: "Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs" CHEM. PHARM. BULL. (1993), 41(5), 978-80 CODES: CPBTAL; ISSN: 0009-2363, 1993,
- D4: WO 97 18826 A (INTRABIOTICS PHARMACEUTICALS I; UNIV CALIFORNIA (US) May 29, 1997
- D5: WO 94 18323 A (XOMA CORP) August 18, 1994
- D6: WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) November 28, 1996
- D7: WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) June 22, 1995
- D8: WO 90 04408 A (MAGAININ SCIENCES INC) May 3, 1990

2. D1 discloses the "PC-8" peptide (see tables page 637 and 638, left column, next-to-last paragraph, lines 1 and 2). PC-8 is a peptide derived from an antibiotic peptide devoid of a sulphide bond, corresponding to the formula (I) according to claim 3. Its antibiotic potential was verified in D1. The subject of claims 1-5 is therefore not new (article 33(2) PCT).

3. D2 describes the T10 peptide (see figure 1) which is included in the subject of claims 1 and 2. The subject of claims 1 and 2 is therefore not new (article 33(2) PCT).

4. D3 describes the 4-Ala-T-I and 4Cys (Acm)-T-I peptides (see figure 1) which are included in the subject of claims 1 and 2. The subject of claims 1 and 2 is therefore not new (article 33(2) PCT).

PRELIMINARY INTERNATIONAL EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET International application no. PCT/FR98/01757

5. D4 describes the PC-8 antibiotic peptide (see page 75, table 17 and line 29) which is included in the subject of claims 1-5. The subject of these claims is therefore not new (article 33(2) PCT).

6. D5 describes polypeptides (see for ex. seq. id. 1 and 2) which have antibiotic activity and which are also described as being devoid of a sulphide bond (even though they contain Cys). The subject of claim 1 is therefore not new (article 33(2) PCT).

7. D6 discloses peptides with antibiotic activity and which are also described as being devoid of a sulphide bond (even though they contain Cys) (see for ex. page 18, line 8 on page 20, line 22). The subject of claim 1 is therefore not new (article 33(2) PCT).

At the same time, D6 describes peptides with antibiotic activity characterized by the fact that all the Cys radicals except one are replaced by another amino acid radical (see page 19, lines 35 and 38, page 20, lines 4, 6, 13, 14 and 15). The subject of claims 1 and 2 is therefore not new (article 33(2) PCT).

D6 also describes peptides with antibiotic activity characterized by the fact that all the Cys radicals are replaced by another amino acid radical (see page 22, lines 33 to 37). The subject of claims 1 to 5 is therefore not new (article 33(2) PCT).

8. D7 describes peptides with id. seq. 1-3, 5 to 15 and 18 to 21 (see pages 28 to 36) with antibiotic activity characterized by the fact that all the Cys radicals are replaced by another amino acid radical. The subject of claims 1 to 5 is therefore not new (article 33(2) PCT).

9. D8 describes peptides I to V (see pages 8 and 9) and (1) to (8) (see page 17) devoid of a sulphide bond and having antibiotic activity. The subject of claims 1 to 5 is therefore not new (article 33(2) PCT). Otherwise D8 describes that the amphipatic peptides forming pores in the membrane of pathogenic cells may be combined with toxic ions in order to increase the antibiotic action of these peptides.

Mintz, Levin et al. Ref. No: 19904-009; BREESE-9
Breese Majerowicz Ref. No: S091B1PCT/US

PRELIMINARY INTERNATIONAL EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET International application no. PCT/FR98/01757

10. The plaintiff found that the linear derivatives of protegrin and tachyplesin in which the Cys are replaced by various natural amino acids are non-toxic and do not have lytic activity, but are capable of rapidly crossing mammalian cell membranes through a passive mechanism. They can thereby constitute a vectoring system for active substances.

Such activity is not described in the previous method according to the international research report. It is for this reason that the subject of the present application which has not yet been disclosed in the previous method (see paragraphs 1 to 8) seems to imply inventive activity (article 33(3) PCT).

Concerning point VII

1. Contrary to what is required by regulation 5.1 a) ii) PCT, the description does not indicate the state of the previous pertinent technique disclosed in documents D1 to D6 and D8 and does not cite these documents.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|---|--|---|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K | | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 99/07728 (43) Date de publication internationale: 18 février 1999 (18.02.99) |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01757</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 août 1998 (06.08.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/10297 12 août 1997 (12.08.97) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): SYNT-EM (S.A.) [FR/FR]; Parc Scientifique, Georges Besse, F-30000 Nîmes (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CALAS, Bernard [FR/FR]; 360, avenue du Père Prévost, F-34090 Montpellier (FR). GRASSY, Gérard [FR/FR]; 23, rue du Pradas, F-34470 Pérols (FR). CHAVANIEU, Alain [FR/FR]; 680, chemin des Bausques, F-38820 Assas (FR). KACZOREK, Michel [FR/FR]; Syntem, 145, allée Charles Babbage, F-30900 Nîmes (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p> | | <p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p> | |
| <p>(54) Title: LINEAR PEPTIDES DERIVED FROM ANTIBIOTIC PEPTIDES, PREPARATION AND USE FOR VECTORING ACTIVE SUBSTANCES</p> <p>(54) Titre: PEPTIDES LINEAIRES DERIVES DE PEPTIDES ANTIBIOTIQUES, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR VECTORISER DES SUBSTANCES ACTIVES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns peptides derived from antibiotic peptides or analogues thereof, characterised in that they are devoid of sulphide bond. The invention also concerns the use of these linear peptides for vectoring chemical substances and chemical compounds formed by said peptides coupled with at least an active substance. The invention further concerns the preparation of said peptides and compositions containing them.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des peptides dérivés de peptides antibiotiques ou d'analogues de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus de pont disulfure. L'invention concerne également l'utilisation de ces peptides linéaires pour la vectorisation de substances chimiques ainsi que les composés chimiques formés de ces peptides couplés à au moins une substance active. L'invention concerne encore la préparation de ces peptides et de ces composés et les compositions les contenant.</p> | | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|--|----|---------------------------------------|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

5/pept.

09/485571

428 Recd PCT/PTO 11 FEB 2000

PEPTIDES LINÉAIRES DÉRIVÉS DE PEPTIDES
ANTIBIOTIQUES, LEUR PRÉPARATION ET LEUR UTILISATION POUR
VECTORISER DES SUBSTANCES ACTIVES.

5

La présente invention concerne des peptides linéaires dérivés de peptides antibiotiques et leur utilisation pour vectoriser des substances actives. Plus particulièrement l'invention a pour objet de nouveaux composés formés d'un dérivé linéaire d'un peptide antibiotique lié à au moins une substance active, ainsi que la préparation de ces composés et les compositions les contenant.

10

A côté de leur système immunitaire responsable de mécanismes spécifiques de défense contre les agents infectieux, les vertébrés possèdent de nombreux peptides à activité antimicrobienne (Nicolas, P. et al., 1995, Annual Rev. Microbiol. 49, 277-304). Ces peptides sont seulement présents chez les invertébrés à courte durée de vie et à taux de renouvellement élevé, chez lesquels un système immunitaire à mémoire, long à s'établir et à développer une réponse appropriée, serait inadapté.

15

Les peptides antimicrobiens des vertébrés, quelque soit leur origine, vertébrés inférieurs ou supérieurs, tissus myéloïdes ou non myéloïdes, possèdent un certain nombre de propriétés communes :

20

- Une forte basicité due à la présence de nombreuses arginines et lysines.

25

- La capacité de former des structures amphipatiques. On entend par structure amphipatique des structures dans lesquelles les résidus hydrophobes sont spatialement séparés des résidus hydrophiles.

30

- Un très large spectre d'activité. Ils sont capables de détruire rapidement des bactéries (Gram+ et Gram-), des champignons, quelques protozoaires, des

virus à membrane et même certaines lignées de cellules cancéreuses.

Selon leur structure, les peptides antibiotiques peuvent être classés en trois grandes familles :

- Les peptides antibiotiques à hélices α amphipatiques : cécropines et maganines (Maloy, W. L. et al., 1995, BioPolymer 37, 105-122).

- Les peptides antibiotiques à feuilles β réunis par des ponts disulfures : défensines (Lehrer, R. I. et al., 1991, Cell 64:229-230 ; Lehrer, R. I. et al., 1993, Ann. Rev. Immunol. 11:105-128), protégrines (Kokryakov, V. N. et al., 1993, FEBS 337:231-236), tachyplésines (Nakamura, T. et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:16709-16713 ; Miyata, T et al., 1989, J. Biochem. 106:663-668).

- les peptides antibiotiques à chaînes déstructurées contenant de nombreux coudes liés à la présence de multiples prolines : bacténécines et PR39 (Frank, R. W. et al., 1991, Eur. J. Biochem. 202, 849-854).

Malgré la diversité de leurs séquences, la plupart des peptides antibiotiques agissent par lyse directe de la membrane des cellules pathogènes. Leur nature basique facilite leur interaction avec les phospholipides chargés négativement, et leur caractère amphipatique leur permet ensuite de s'incorporer dans la membrane où ils s'agrègent pour former des pores par lesquels la cellule perd sa substance. Il est généralement admis que leur sélectivité préférentielle pour les cellules procaryotes, est due à la composition particulière de leurs membranes qui contiennent davantage de phospholipides anioniques que celles d'eucaryotes. De plus, les membranes plasmiques de cellules de mammifères contiennent toutes du cholestérol, dont le rôle est d'en moduler la fluidité

et qui pourrait gêner l'incorporation des peptides antibiotiques. Toutefois, la spécificité de ces derniers pour les microorganismes est faible si bien qu'ils présentent une forte cytotoxicité ce qui en limite l'utilisation.

La présence de peptides antibiotiques chez les vertébrés et plus particulièrement chez les mammifères soulève de nombreuses questions. Les immunologistes supposent que les composés à activité antimicrobienne non-spécifique que l'on rencontre au niveau des invertébrés constituent un moyen ancestral de défense qui a ensuite évolué pour conduire aux systèmes à mémoire beaucoup plus complexes. Quel est donc l'intérêt pour les mammifères, par exemple, d'avoir conservé certains peptides à activité antibiotique ? On admet que ces petites molécules toujours présentes dans les fluides biologiques, ou encore séquestrées dans certaines structures lymphocytaires, pourraient constituer une première ligne de défense en attendant que les anticorps spécifiques soient sécrétés (Nicolas, P. et al., 1995, Annual Rev. Microbiol. 49, 277-304). Ils pourraient également participer au sein des macrophages, à la destruction des membranes plasmiques des organismes pathogènes.

Quelque soit leur rôle exact, les peptides antibiotiques ont un intérêt considérable du fait de leur large spectre d'action et de la difficulté que les microorganismes ont à mettre en place des stratégies d'inactivation. De ce fait de très nombreuses recherches sont entreprises pour essayer de trouver de nouvelles molécules et d'obtenir des analogues plus performant que les peptides parents. Il se peut que dans l'avenir, ces peptides antibiotiques soient appelés à remplacer les antibiotiques issus de bactéries ou de champignons. Ainsi les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les numéros WO95/03325, WO96/37508 et

WO97/02287 décrivent une nouvelle classe de peptides antibiotiques, désignés "protégrines", isolés de leucocytes de porcs ou encore préparés par synthèse chimique ou par génie génétique et présentant des 5 activités antibactériennes, antivirales et antifongiques.

Actuellement, les peptides antibiotiques à feuilles β réunis par des ponts disulfures (défensines, 10 protégrines, tachyplésines) sont particulièrement étudiés étant donné leur puissante activité antimicrobienne (bactéries, certains virus, champignons et parasites). Dans cette famille, les protégrines et 15 les tachyplésines sont certainement les molécules les plus prometteuses étant donné la simplicité de leur structure et la facilité relative de leur synthèse.

On désigne sous le nom de protégrines un ensemble de cinq peptides désignés PG-1, PG-2, PG-3, PG-4 et PG-5 dont les séquences sont données ci-dessous, étroitement apparentés et isolés de leucocytes de porc 20 (V.N. Kokryakov & col. FEBS lett. 327, 231-236) :

PG-1 : RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH₂

PG-2 : RGGRLCYCRRRFCICV..-NH₂

PG-3 : RGGGLCYCRRRFCVCVGR-NH₂

PG-4 : RGGRLCYCRGWICFCVGR-NH₂

PG-5 : RGGRLCYCRPRFCVCVGR-NH₂

25 Les tachyplésines (Tamura, H. et al., 1993, Chem. Pharm. Bul. Tokyo 41, 978-980), désignées T1, T2 et T3 et les polyphémusines (Muta, T., 1994, CIBA Found. Sym. 186, 160-174), désignées P1 et P2, dont les 30 séquences sont données ci-dessous, sont des peptides homologues isolés de l'hémolymphé de deux crabes, *Tachypleus tridentatus* pour les tachyplésines T1, T2 et T3 et *Limulus polyphemus* pour les polyphémusines P1 et P2.

35 P1 : RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH₂

P2 : RRWCFRVCYKGFCYRKCR-NH₂

T1 : KWCFRVCYRGICYRRCR-NH₂

T2 : RWCFRVCYRGICYRKCR-NH₂

T3 : KWCFRVCYRGICYKRCR-NH₂

5 Protégrines, tachyplésines et polyphémusines contiennent une forte proportion de résidus basiques (lysines et arginines) et possèdent quatre cystéines qui forment deux ponts disulfures parallèles. Ces trois familles de peptides présentent également des homologies avec certaines défensines et en particulier avec la 10 défensine humaine NP-1 (Kokryakov, V. N. et al., 1993, Febs Let. 327, 231-236).

Tachyplésines et protégrines possèdent une structure tridimensionnelle voisine. Il s'agit d'un feuillet β antiparallèle stabilisé par les deux ponts disulfures. Ces ponts jouent un rôle important dans 15 l'activité antibactérienne des protégrines et des tachyplésines. Leur suppression, soit en protégeant les groupements SH par des acétamidométhyyles, soit en remplaçant les cystéines par des alanines ou des 20 glycines, conduit à des analogues pratiquement dénués d'activité *in vivo* (Lehrer, R. I. et al., 1996, Eur. J. Biochem. 240:352-357).

25 Comme indiqué précédemment, les protégrines et les tachyplésines ont une importante activité lytique sur les cellules procaryotes. Les travaux de recherche réalisés par la Demanderesse sur la cytotoxicité de ces peptides sur des cellules de mammifère en culture, ont permis de mettre en évidence, avant la mort des cellules, des quantités non-négligeables de protégrines 30 et de tachyplésines dans le cytoplasme desdites cellules. Il a été envisagé que la présence des peptides dans le cytoplasme pouvait résulter d'un transport par le biais de pores, mais ces pores ne sont perméables qu'aux ions et aux petites molécules et leur diamètre 35 est trop petit pour permettre le passage des peptides antibiotiques. Il semblerait que les protégrines et

tachyplésines, en plus de perforer la membrane plasmique, soient capables de la traverser.

Il est connu que la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne des protégrines et des tachyplésines sont dus à leur capacité de s'agréger à l'intérieur de la membrane pour former des canaux multimériques (Mangoni, M. et al., 1996, Febs Let. 383, 93-98). La Demanderesse a alors envisagé que cette agrégation soit reliée à la structure tertiaire de ces peptides antibiotiques qui comportent plusieurs résidus cystéines, et des dérivés linéaires des protégrines et des tachyplésines dans lesquels les cystéines sont remplacées par divers acides aminés naturels, ont été synthétisés. Ces peptides ont été couplés, par leur extrémité N-terminale, à une molécule fluorescente ou à la biotine et la répartition de ces marqueurs à l'intérieur de la cellule a été observée par microscopie confocale.

Il a ainsi maintenant été trouvé que ces peptides sont non-toxiques et sans activité lytique mais sont par contre capables de traverser rapidement les membranes des cellules de mammifères par un mécanisme passif.

Ces dérivés linéaires des peptides antibiotiques constituent donc un nouveau système de vectorisation de substances actives qui est non toxique.

Par système de vectorisation, on entend selon l'invention, un processus capable de transporter ladite substance active jusqu'à une cible, comme par exemple :

- de faire traverser la membrane cellulaire à une substance active et de permettre la distribution de celle-ci dans le cytoplasme et/ou dans le compartiment nucléaire,

- d'amener une substance active au niveau d'un organe particulier, par exemple de faire franchir à cette substance active la barrière hémato-encéphalique,

5 - de forcer cette substance active à interagir spécifiquement avec un type cellulaire donné, comme par exemple les hématies.

10 La présente invention a donc pour objet des peptides dérivés des peptides antibiotiques ou d'analogue de ceux-ci, caractérisés en ce qu'ils sont dépourvus de pont disulfure.

15 On entend par analogue de peptides antibiotiques, un peptide dont la séquence en acides aminés a été modifiée sans que cela n'entaine de modification dans les propriétés antibiotiques dudit peptide.

20 L'absence de pont disulfure dans les peptides de l'invention peut être obtenue par tout moyen connu de l'homme du métier, comme par exemple :

25 - en supprimant ou en remplaçant par d'autres acides aminés les résidus de cystéine de la séquence du peptide antibiotique,

30 - en bloquant les groupes -SH des résidus cystéines de façon à ce qu'ils ne forment pas de pont disulfure,

dès lors bien entendu que le peptide obtenu présente les propriétés de vectorisation sans toxicité pour les cellules décrites précédemment.

35 Ces modifications peuvent être réalisées lors de la préparation des peptides de l'invention, plus particulièrement par synthèse chimique ou par expression d'un gène codant pour ledit peptide, ou directement sur un peptide antibiotique par action d'agents chimiques permettant d'ouvrir et de bloquer les groupes -SH des résidus de cystéine.

5 Les modifications ci-dessus concernent avantageusement tous les résidus de cystéines du peptide antibiotique, mais dès lors que la présence d'un unique résidu de cystéine ne permet pas la formation de pont disulfure, les peptides de l'invention peuvent contenir une seule cystéine. Les peptides antibiotiques naturels présentent généralement 4 ou 6 résidus de cystéine capables de former deux ou trois ponts disulfures, aussi dans les peptides de l'invention, l'une seulement de ces 10 cystéines peut être maintenue et les trois ou cinq autres sont modifiées ou bloquées.

15 Les peptides antibiotiques dont dérivent les peptides de l'invention peuvent être des défensines, des protégrines, des tachyplésines ou leurs analogues, dont les propriétés antibiotiques leur sont conférées par leur structure tertiaire résultant de la présence de ponts disulfures.

20 Des peptides linéaire selon l'invention répondent à l'une des formules suivantes :

BXXBXXXXBBBXXXXXXB (I)

BBXXXBXXXBXXXXBBXB (II)

25 qui peuvent être aussi représentées par la formule unique (III) suivante :

B(XB)X(XB)X(XB)XX(XB)B(XB)XXX(XB)(XB)XB

dans lesquelles :

30 - les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidus d'acide aminé aliphatique ou aromatique,

35 ou sont constitués d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs de l'une des formules (I) ou (II), dès lors que cette

séquence présente les propriétés de vectorisation sans toxicité pour les cellules décrites précédemment.

5 B et X peuvent être des acides aminés naturels ou non, y compris des acides aminés de configuration D.

10 On peut citer comme exemple, les significations de B et X suivantes :

15 - B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

20 - X est choisi parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{AcM}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

30 L'invention concerne aussi des dérivés des peptides de formules (I) ou (II) comme lesdits peptides sous forme rétro, ou des fragments des peptides de formules (I) ou (II) constitués de cinq et de préférence sept acides aminés successifs de l'une des formules (I) ou (II).

Parmi les peptides de l'invention, on peut citer plus particulièrement ceux répondant aux formules suivantes :



dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,
- R représente l'arginine, et
- les groupes X identiques ou différents

représentent un acide aminés naturel ou non (y compris acides aminés de configuration D) aliphatiques ou aromatiques, comme la glycine, lalanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{AcM}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

Parmi les peptides de formules (I) et (II) ou leurs dérivés, l'invention envisage à titre spécifique ceux dérivés de protégrines et de tachyplésines rapportés dans les tableaux I et II ci-dessous.

Tableau I : dérivés de protégrines

| Code | séquence | Modification |
|--------|----------------------------------|---|
| SM1738 | RGGRRLSYSRRRFSVSVGR | Tête de série |
| SM1736 | rggrls y ssrrrfsvsvgr | Aa de forme D de SM1738 |
| SM1727 | RGVSVSFRRRSYSLRGGR | Forme rétro de SM1738 |
| SM1739 | EGGELSYSEEEFSVSVGE | Inversion de charge (R → E) |
| SM2187 | RGGRLLAYRLLRFAIRVGR | Augmentation du caractère amphipathique |
| SM2188 | OGGOXXBOXXOBXXXOXG | Augmentation du caractère hydrophobe |
| SM2189 | RAARLGYRXXRGZRVGR | Augmentation du caractère amphipathique |
| SM2194 | YRRRFSVSVR | Partie C terminale de SM2193 |
| SM2195 | RRLSYSRRRF | Partie N terminale de SM2193 |
| SM2193 | RRLSYSRRRF S VSVR | Diminution de la flexibilité (délétion G) |
| SM2196 | RGGRRLSYSRRRF S TSTGR | Inhibition dimérisation |

Tableau II : dérivés de tachyplésines

5

| Code | Séquence | Modification |
|--------|---|---|
| SM1726 | KWSFRVSYRGISYRRSR | Tête de série |
| SM2307 | RWSFRVSYRGISYRRSR | Mutation K → R |
| SM2392 | rwsfrv s yrgis y rrsr | Aa de forme d (de SM2307) |
| SM2309 | kwsfrv s yrgis y rrsr | Aa de forme d (de SM1726) |
| SM2310 | RSRRYSIGRYSVRFSWK | Forme rétro |
| SM2190 | OBXBOXXBOGXOBXXOX | Augmentation du caractère hydrophobe |
| SM2191 | KWAFRVAYRGIRYLLRL | Augmentation du caractère amphipathique |
| SM2192 | KYAWRVAHRGIRWLLRX | Augmentation du caractère amphipathique |

Dans les séquences des tableaux I et II ci-dessus, B représente la Naphylalanine, O représente l'Ornithine, X représente la Norleucine et Z représente la Norvaline.

10

15

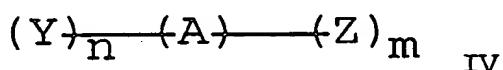
L'invention concerne aussi l'utilisation des peptides ci-dessus pour la vectorisation d'une ou plusieurs substances actives tant pour des applications thérapeutiques que de diagnostic. A titre de substance active, l'invention envisage notamment des protéines ou fragments de protéines, comme des polypeptides ou

5

peptides, des anticorps ou partie d'anticorps, des acides nucléiques et oligonucléotides ou des ribozymes, ou encore, bien entenu des molécules chimiques actives pour le traitement ou la prévention de pathologies humaines ou animales, comme par exemple et de manière non limitative des antitumoraux, des antiviraux, des agents anti-inflammatoires, des agents empêchant la dégradation d'organes et/ou de tissus, etc...

10 Dans le domaine du diagnostic, la substance active peut être un marqueur radioactif, un marqueur coloré, ou tout autre moyen ou substance capable de révéler un métabolisme ou une pathologie.

15 L'invention a donc également pour objet des composés de formule (IV) suivante, ainsi que les compositions les contenant :



20 dans laquelle

- A représente un peptide linéaire dérivé d'un peptide antibiotique conforme à l'invention,

- Z représente une substance active, comme défini ci-dessus,

- Y représente un agent signal,

25 - n est 0 et ou plus, et avantageusement 0 ou 1,

- m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10 avantageusement jusqu'à 5.

30 Ainsi, les composés de formule (IV) ci-dessus sont formés à partir d'un peptide de l'invention couplé à une ou plusieurs substances actives, identiques ou différentes, représentées par le groupe (Z) dans la formule (IV), et éventuellement un ou plusieurs agents de signal, représentés par le groupe (Y) dans la formule (IV), ayant un rôle d'adressage du composé de formule (IV) vers un type cellulaire, un site ou compartiment de

la cellule ou un tissus particulier. Plus particulièrement, l'agent signal (Y) est un oligopeptide ou une protéine, comme un peptide signal, un signal de localisation nucléaire, un fragment d'anticorps, ou une molécule chimique ligand ou anti-ligand d'un récepteur.

5 Dans une forme toute particulière de réalisation des composés de formule (IV), le groupe (Y) est fixé au groupe (Z).

10 Le couplage, symbolisé par les traits horizontaux dans la formule (IV), peut être réalisé par tout moyen de liaison acceptable compte tenu de la nature chimique, de l'encombrement et du nombre de groupes (Z) et (Y) dans les composés de formule (IV), comme des liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques, 15 clivables ou non-clivables dans les milieux physiologiques. Le couplage peut être effectué en n'importe quel site du peptide (A), dans lequel des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH₂ sont naturellement présents ou ont été introduits.

20 L'invention envisage aussi la fixation de plusieurs groupes (Z) sur un même site du peptide (A), soit directement, si ce site comporte plusieurs groupements fonctionnels, comme dans le cas d'une lysine C- ou N-terminale, soit indirectement via un groupe intermédiaire portant plusieurs groupements réactionnels permettant d'y fixer plusieurs groupes (Z).

25 Les positions de couplage préférées pour la substance active sont au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des groupements amines primaires portés par les chaînes latérales des lysines du peptide (A). Dans le cas où l'on utilise l'extrémité C-terminale du peptide (A) pour accrocher la substance active (Z), l'extrémité N-terminale est disponible pour le couplage éventuel à un agent signal (Y) permettant l'adressage du composé de

l'invention soit vers le noyau, soit encore vers un type tissulaire particulier.

En effet, par exemple dans le cas du couplage à l'extrémité C-terminale d'un peptide linéaire de l'invention, d'une substance active constituée par un marqueur fluorescent, ou de la biotine, ou encore d'une molécule médicamenteuse telle que la doxorubicine, le complexe covalent peptide-drogué après administration se répartit dans le cytoplasme de la cellule cible. Il 5 est possible d'amener ce complexe dans le compartiment nucléaire en couplant à l'extrémité N-terminale du peptide une courte séquence basique, par exemple d'environ 7 acides aminés, correspondant à un signal de 10 localisation nucléaire. Dans ces conditions, la biotine 15 ou la doxorubicine se retrouvent dans le noyau de la cellule.

De la même manière, il est possible de vectoriser une drogue vers un type cellulaire donné, en ajoutant à l'extrémité N-terminale du peptide linéaire de l'invention couplé à son extrémité C-terminale à un 20 médicament, une séquence peptidique capable de reconnaître spécifiquement un déterminant présent à la surface de type cellulaire. Ainsi, le pentadecapeptide α M2 (Swolapenko, G. B. et al., 1995, The Lancet 346, 25 1662-65) synthétique, fragment d'un anticorps monoclonal, dirigé contre un antigène exprimé par les cellules de cancer du sein (Tumour Associated Antigen Polymorphic Epithelial Mucin), conserve une bonne 30 affinité pour ces cellules. Il est donc possible en associant α M2 à un ensemble peptide linéaire-médicament, d'amener cet ensemble préférentiellement vers les cellules qui expriment la caractéristique antigénique liée au cancer mammaire.

Les composés de formule (IV) peuvent être 35 préparés par synthèse chimique ou en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

On peut utiliser pour les synthèses chimiques des appareils commerciaux permettant d'incorporer des acides aminés non-naturels, tels que les énantiomères D et des résidus ayant des chaînes latérales ayant des hydrophobicités et des encombrements différents de ceux de leurs homologues naturels. Au cours de la synthèse, il est évidemment possible de réaliser un large éventail de modifications, par exemple introduire sur le N-terminal un lipide (prenyl ou myristyl) de façon à pouvoir ancrer le peptide de l'invention et donc le composé de formule (IV) à une membrane lipidique telle que celle d'un liposome constitué de lipides chargés positivement. Il est également possible de remplacer une ou plusieurs liaisons peptidiques (-CO-NH-) par des structures équivalentes comme -CO-N(CH₃)-, -CH₂-CH₂-, -CO-CH₂-, ou bien d'intercaler des groupes comme -CH₂-, -NH-, -O-.

On peut également obtenir les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique à partir d'une séquence d'acide nucléique codant pour celui-ci. La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour un peptide linéaire dérivé de peptide antibiotique. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour un composé de formule (IV) ou une partie de celui de nature protéique. Ces séquences d'acides nucléiques peuvent être des ADN ou ARN et être associées à des séquences de contrôle et/ou être insérées dans des vecteurs. Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide. Ces acides nucléiques et vecteurs sont utiles pour produire les peptides linéaires et les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique dans un hôte cellulaire. La préparation de ces

5 vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des peptides linéaires ou des composés de formule (IV) peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, un tel procédé de production d'un peptide selon l'invention consiste :

10 - à transférer une molécule d'acide nucléique ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production du peptide,

15 - à isoler, par tous moyens appropriés les peptides de l'invention.

15 L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans ce type de procédé peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes. L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant les peptides linéaires ou les composés de formule (IV) ou partie de ceux-ci de nature protéique.

20 L'invention se rapporte aussi :

25 - aux compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins un composé de formule (IV) éventuellement associé à un véhicule ou support acceptable.

30 - aux agents de diagnostic constitués d'au moins un composé de formule (IV).

35 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant à la préparation de composés de formule (IV) ainsi qu'aux travaux de recherche ayant mené à la mise en évidence des propriétés de vectorisation des peptides

linéaires de l'invention dérivés de peptides antibiotiques.

Exemple 1 : Fixation de la biotine et de la doxorubicine sur des analogues linéaires de peptides antibiotiques.

1) Préparation des peptides linéaires.

Les trois peptides de séquences ci-dessous ont été synthétisés :

RGGRLLXYXRRRFXVXVGR-NH₂

RRWXFRVXYRGFXYRKXR-NH₂

KWXFRVXYRGIXYRRXR-NH₂

dans lesquels X représente les résidus serine, thréonine ou alanine.

Ces peptides dérivent respectivement des séquences de la protégrine PG-1 de formule :

RGGRRLCYCRRRFCVVCVGR-NH₂,

de la tachyplésine 1 de formule :

KWCFRVCYRGICYRRCR-NH₂,

de la polyphémusine de formule :

KWXFRVXYRGIXYRRXR-NH₂ .

Ces trois peptides peuvent être préparés indifféremment soit à partir d'une chimie BOC, soit à partir d'une chimie Fmoc, par des procédés classiques de synthèse en phase solide ou homogène.

2) Fixation de la biotine sur les peptides linéaires.

Le peptide est synthétisé en phase solide et après incorporation de l'arginine N-terminale on ajoute l'acide 5-aminopentanoïque. Le Fmoc ou le Boc N-terminal est enlevé et on fait réagir sur le peptide toujours accroché à la résine le N-hydroxy succimido ester de la biotine dans le diméthylformamide. Après 15 heures de réaction à température ambiante, le peptide

5

biotinilé est coupé du support par action de l'acide trifluoroacétique ou de l'acide fluorohydrique selon des protocoles bien établis dans la chimie des peptides. Le peptide est ensuite purifié par chromatographie liquide à haute pression.

3) Fixation de la doxorubicine sur un peptide linéaire.

10 Pour fixer la doxorubicine, on synthétise en phase solide le peptide de formule :



15

20

Après clivage du support de purification, le peptide est traité par l'anhydre glutarique en présence de triéthylamine. Le peptide est alors purifié et le groupement -COOH porté par le glutaryl en N-terminal est activé par le mélange diisopropylcarbodiimide et 1-hydroxybenzotriazole. Après deux heures de réaction à température ambiante, de la doxorubicine est ajoutée et le mélange est agité pendant 12 heures à 0°C. L'ensemble peptide-doxorubicine est alors purifié par chromatographie liquide à haute pression.

Exemple 2 : Capacité des peptides linéaires de l'invention à passer les membranes de cellules.

25

1) Modèles cellulaires.

La capacité des peptides à passer les membranes a été testée sur divers types cellulaires (MCF7, MCF7R, HL60, HL60R, HeLa).

30

Les cellules sont cultivées sur RPMI 1640 (Gibco) auquel on ajoute 10% (v/v) de serum veau foetal, 2mM glutamine and 2mM penicilline/streptomycine, à 37°C. 30 000 cellules sont ensemencées dans des chambres Lab Tek et cultivées pendant 1 jour.

35

2) Traitements par les peptides linéaires-biotine préparés conformément à l'exemple 1 (2).

Les cellules sont incubées dans de l'Opti-Mem (Gibco) pendant une heure avant d'être traitées pendant des temps variables avec les peptides marqués à la biotine.

Ces derniers sont obtenus conformément à l'exemple 1(2) en traitant 1 équivalent de peptide linéaire par 2 équivalents d'ester de N-hydroxysuccinimide de la biotine, puis purifié par chromatographie liquide à haute pression.

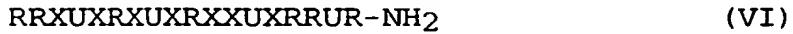
Les cellules sont ensuite fixées avec une solution à 3.7% de paraformaldéhyde pendant 5 minutes à 25°C, puis rincées trois fois avec du PBS. Elles sont ensuite perméabilisées par du Triton 0.1% (1 min, température ambiante). Après trois rinçages au PBS, les cellules sont incubées 10 min avec 200 µl d'anticorps TexRed dilué au 300^{ème} et rincées trois fois au PBS. Les lames sont enfin montées avec une solution Mowiol-Dabco et observées au photomicroscope Axiophot.

3) Traitements par les peptides linéaires-doxorubicine préparés conformément à l'exemple 1 (3).

Les cellules sont incubées pendant 15 minutes, puis rincées avec du PBS et ensuite la doxorubicine présente dans la cellule est dosée par chromatographie.

4) Résultats.

a) Parmi les peptides étudiés, ceux qui passent le plus facilement les membranes sont ceux répondant aux formules suivantes :



35 dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,

- R représente l'arginine, et
- les groupes X identiques ou différents représentent un acide aminés naturel ou non (y compris acides aminés de configuration D) aliphatiques ou aromatiques, comme la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{AcM}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

b) Les résultats des expériences menées avec la doxorucine montrent une augmentation significative de la concentration plasmique et nucléaire en doxorubicine lorsque celle-ci est couplée au peptide linéaire de l'invention par rapport à l'utilisation de doxorubicine seule.

c) Les expériences avec la biotine ont été effectuées plus particulièrement sur des cellules MCF7 traitées à différents temps par un complexe biotine-peptide de l'invention de formule :

30 biotine-RGGRLSYSRRRFSVSVGR-NH₂

Ces travaux ont donné lieu à des clichés (non représentés) :

- Contrôle dans lequel la cellule a été traitée avec la biotine seule.

- Traitement de la cellule pendant 2 minutes avec un complexe biotine-peptide linéaire de l'invention.

5 - Traitement de la cellule pendant 30 minutes avec un complexe biotine-peptide linéaire de l'invention.

10 On observe dans ces clichés que la biotine seule ne rentre pas dans la cellule et s'accumule faiblement autour de celle-ci. A l'inverse, avec le complexe de l'invention, on constate que la biotine est entraînée rapidement par le peptide linéaire de l'invention à l'intérieur de la cellule où elle est présente dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule.

15 Exemple 3 : Capacité d'internalisation des peptides linéaires de l'invention.

20 Des peptides linéaires de l'invention dérivés de Protégrines et Tachyplésines ont été testés sur différentes lignées cellulaires, dans le but d'évaluer leur internalisation respective.

25 1) Conditions Expérimentales.

Les cellules sont ensemencées à environ 10^4 cellules par puits, 24 h avant l'addition des peptides biotinylés. Elles sont alors à 60-80% de confluence le jour de l'expérience. Les peptides biotinylés sont incubés avec les cellules à la concentration de 10 μ M, pendant 15 minutes, à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO₂ dans un milieu OptiMem,. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS à température ambiante puis sont fixées à la formaline (3,7% de formaldéhyde dans PBS, 10 min à température ambiante). Elles sont ensuite lavées avec du PBS et perméabilisées pendant 15 min avec du PBS-TritonX-100.

5 La révélation est faite avec de la streptavidine-Texas-Red pendant 15 min à l'abri de la lumière et les cellules sont ensuite montées entre lame et lamelle. Elles sont observées en microscopie à fluorescence, et comparées à un témoin positif (Ap43-58), bien décrit dans la littérature, et à un témoin négatif.

10 Les noyaux des cellules ont été colorés avec du Hoechst.

10 2) Lignées cellulaires.

Toutes les lignées testées sont d'origine humaine et ont été obtenues commercialement auprès de l'ATCC.

15 - Lignées non tumorales : MRC5 (fibroblaste de poumon), HuVeC (endothéliale, cordon ombilical).

20 - Lignées tumorales : HT29 (carcinome du colon), HepG2 (hépatoblastome), A172 (glioblastome), HMCB (mélanome).

25 Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO₂. Le milieu de culture est celui recommandé par l'ATCC.

30 3) Peptides testés.

25 Les deux séries de peptides testées sont celles des tableaux I et II.

35 4) Résultats.

30 Les résultats d'internalisation sont montrés dans les tableaux III et IV ci-dessous. Les peptides pénètrent dans les cellules avec différents degrés d'internalisation. Certains (tels que SM1739 et SM2190) ne sont pas internalisés alors que d'autres (tels que SM2307, SM2187, etc...) pénètrent avec une bonne efficacité. Nous avons aussi observé que certains peptides pénètrent beaucoup plus dans un type cellulaire

5

que dans d'autres. Par exemple, le SM2196 a une meilleure internalisation dans les cellules tumorales (HepG2, A172, et HT29) que dans les cellules non tumorales (MRC5 et HuVeC). A l'inverse, le peptide SM1738 pénètre beaucoup plus dans les lignées non tumorales que dans les lignées tumorales. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait un tropisme cellulaire.

10

De manière générale, il apparaît que la forme rétro des têtes de série ne modifie pas de façon significative l'internalisation. L'augmentation de l'hydrophobie a un effet négatif, pour les deux familles de peptides testées. Il convient donc éviter d'augmenter l'hydrophobie. En revanche, une augmentation de l'amphipathie semble avoir un effet positif, au moins pour la famille Protégrine.

15

Tableau III : dérivés de protégrines

| | HepG2 | A172 | HMCB | HuVeC | MRC5 | HT29 | Internalisation |
|--------|-------|------|------|-------|------|------|--------------------------|
| SM1738 | + | + | + | +++ | +++ | + | référence |
| SM1727 | 0 | ++ | ++ | +++ | + | + | pas d'effet significatif |
| SM1736 | ++ | + | +++ | ++++ | ++++ | + | pas d'effet significatif |
| SM1739 | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | effet négatif |
| SM2187 | +++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | +++ | effet positif |
| SM2189 | +++ | ++ | +++ | ++ | ++++ | ++ | effet positif |
| SM2188 | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | 0 | effet négatif |
| SM2193 | ++ | ++ | +++ | ++ | 0 | 0 | effet négatif |
| SM2194 | 0 | + | +++ | + | + | 0 | effet négatif |
| SM2195 | ++++ | 0 | +++ | + | + | ++++ | contradictoire |
| SM2196 | ++++ | ++++ | ++ | + | + | ++++ | tropisme |

20

Les photos de microscopie à fluorescence de l'internalisation sont présentées aux figures 1 et 2. Dans les lignées A172 et HT29, le peptide SM 1738, présenté à titre d'exemple, apparaît localisé majoritairement dans le cytoplasme et dans une zone périnucléaire. Dans le cas de la lignée HuVec, le peptide a une localisation majoritairement

25

cytoplasmique. La colonne de gauche correspond à la coloration du noyau par Hoechst.

Tableau II : dérivés de tachyplésines

5

| | HepG2 | A172 | HMGB | HuVeC | MRC5 | HT29 | Internalisation |
|--------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-----------------|
| SM1726 | +++ | + | +++++ | +++ | +++ | +++ | référence |
| SM2310 | nd | ++ | ++++ | +++ | ++ | +++ | pas d'effet |
| SM2309 | nd | ++++ | ++ | ++ | ++++ | ++++ | nd |
| SM2191 | ++ | ++ | ++ | nd | +++ | +++ | pas d'effet |
| SM2192 | + | +++ | ++++ | +++ | ++++ | ++ | pas d'effet |
| SM2190 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | effet négatif |
| SM2307 | nd | +++++ | +++++ | ++++ | ++++ | +++++ | effet positif |
| SM2392 | nd | +++ | ++++ | ++ | +++ | ++++ | pas d'effet |

nd : non déterminé

10 Les photos de l'internalisation sont présentées aux figures 3 et 4 en annexe. Pour les 3 lignées cellulaires présentées (A172, HT29, HuVeC), le peptide biotinylé est localisé dans le cytoplasme de façon diffuse et marque également de façon nette le nucléole. La colonne de gauche correspond à la coloration du noyau par Hoechst.

15 Exemple 4 : Internalisation de la doxorubicine vectorisée.

20 Les cellules sont ensemencées à environ 10^4 cellules par puits, 24 h avant l'addition des produits. Elles sont alors à 60-80% de confluence le jour de l'expérience. La doxorubicine libre d'une part, ou la doxorubicine couplée au vecteur SM1738 d'autre part, sont incubés avec les cellules MCF7 à la concentration de 10 μ M, pendant 60 minutes, à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO₂ dans le milieu de culture. La localisation subcellulaire de la doxorubicine, naturellement fluorescente, a été déterminée par microscopie confocale. Les résultats sont présentés à la figure 5 en annexe. La localisation est pour partie

cytoplasmique et pour partie nucléaire. Le noyau est alors marqué de façon diffuse.

5 Dans les séquences peptidiques rapportées ci-dessus, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

| | | | |
|----|---|-----|------------------|
| 10 | A | Ala | alanine |
| | C | Cys | cystéine |
| | D | Asp | acide aspartique |
| | E | Glu | acide glutamique |
| | F | Phe | phénylalanine |
| | G | Gly | glycine |
| 15 | H | His | histidine |
| | I | Ile | isoleucine |
| | K | Lys | lysine |
| | L | Leu | leucine |
| | M | Met | méthionine |
| 20 | N | Asn | asparagine |
| | P | Pro | proline |
| | Q | Gln | glutamine |
| | R | Arg | arginine |
| | S | Ser | sérine |
| 25 | T | Thr | thréonine |
| | V | Val | valine |
| | W | Trp | tryptophane |
| | Y | Tyr | tyrosine |

REVENDICATIONS

5 1) Peptide dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de pont disulfure.

10 2) Peptide dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, caractérisé en ce que tous les résidus cystéines, éventuellement sauf un, sont 15 supprimés, remplacés par un autre résidu d'acide aminé ou bloqués au niveau de leur groupe SH.

15 3) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des formules suivantes :

BXXBXXXXBBBXXXXXXB (I)

BBXXXBXXXBXXXXBBXB (II)

dans lesquelles :

20 - les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

25 - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique,

30 ou en ce qu'il est constitué d'une succession d'au moins 5, et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs de l'une des formules (I) ou (II).

35 4) Peptide linéaire selon la revendication 3, caractérisé en ce que les groupes B sont choisis parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

5

10

15

20

25

30

35

5) Peptide linéaire selon l'une des revendications 3 à 4, caractérisé en ce que les groupes X sont choisis parmi la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{AcM}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotéraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

6) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des formules suivantes :



dans lesquelles

- U représente la sérine ou la thréonine,
- R représente l'arginine, et
- les groupes X identiques ou différents représentent un acide aminés naturel ou non, y compris acides aminés de configuration D, aliphatiques ou aromatiques, comme la glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine^{AcM}, la penicillamine, la méthionine, la serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotéraline carboxylique,

la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la β -cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la β -homoleucine, l'homophénylalanine, la 5 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

10 7) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de séquences suivantes :

RGGRLSYSRRRFSVSVGR,

RGVSFSFRRRSYSLRGGR,

EGGELSYSEEEFSVSVGE,

15 RGGRLAYRLLRFAIRVGR,

OGGOXXBOXXOBXXXOXG,

RAARLGYRXXRFGZRVGR,

YRRRFSVSVR,

RRLSYSRRRF,

20 RRLSYSRRRFSVSVR,

RGGRLSYSRRRFSTSTGR,

où B représente la Naphtylalanine, O représente l'Ornithine, X représente la Norleucine et Z représente la Norvaline.

25 8) Peptide linéaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, de séquences suivantes :

KWSFRVSYRGISYRRSR,

RWSFRVSYRGISYRRSR,

30 RSRRYSIGRYSVRFSWK,

OBXBOXXBOGXOBXXOX,

KWAFRVAYRGIRYLLRL,

KYAWRVAHARGIRWLLRX

où B représente la Naphtylalanine, O

35 représente l'Ornithine, X représente la Norleucine et Z représente la Norvaline.

9) Utilisation d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci, dépourvu de pont disulfure, pour vectoriser des substances actives dans un organisme.

5

10) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour vectoriser des substances actives dans un organisme.

10

11) Composé de formule (IV) suivante :



dans laquelle

15 - A représente un peptide linéaire dérivé d'un peptide antibiotique ou d'un analogue de celui-ci,

- Z représente une substance active,

- Y représente un agent signal,

- n est 0 et ou plus, et avantageusement 0 ou 1,

20

- m est 1 ou plus, et de préférence jusqu'à 10, avantageusement jusqu'à 5.

25

12) Composé de formule (IV) dans laquelle A est définie comme dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.

30

13) Composé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que le couplage entre le peptide linéaire (A) et le groupe (Z) ou les groupes (Z) et (Y) est réalisé par une ou plusieurs liaisons covalentes, hydrophobes ou ioniques.

35

14) Composé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'une au moins des substances actives (Z) est fixée par une liaison covalente soit aux extrémités N-terminale ou C-

terminale, soit au niveau des groupements amines primaires portés par les chaînes latérales des lysines, du peptide linéaire (A).

5 15) Composé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce qu'au moins un agent signal (Y), s'il est présent, est fixé par une liaison covalente à l'extrémité N-terminale du peptide linéaire (A).

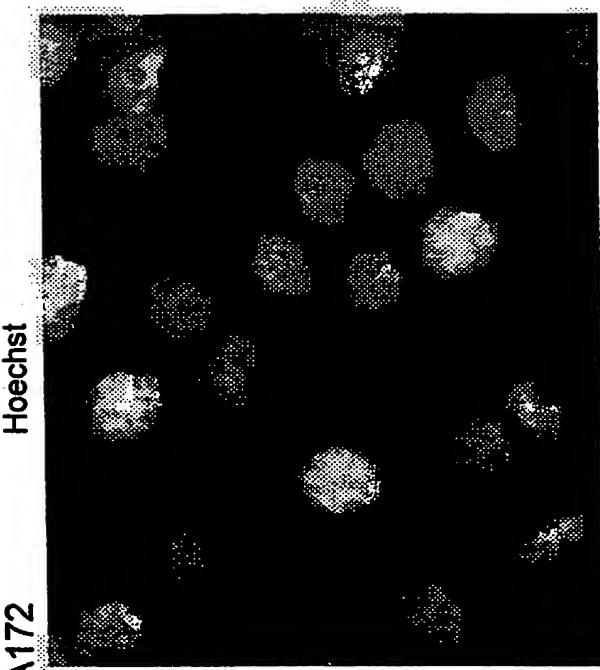
10 16) Composition pharmaceutique caractérisé en ce qu'elle comprend comme principe actif au moins un composé de formule (IV) selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

15 17) Un agent de diagnostic constitué d'au moins un composé de formule (IV) selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

1/5

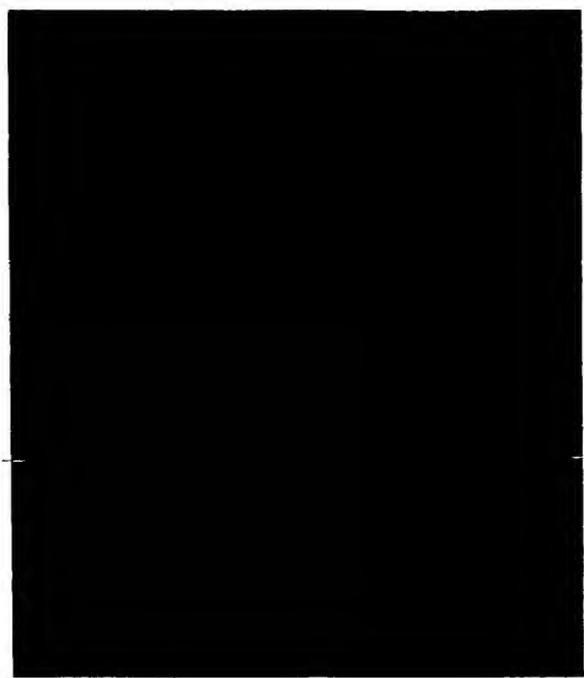
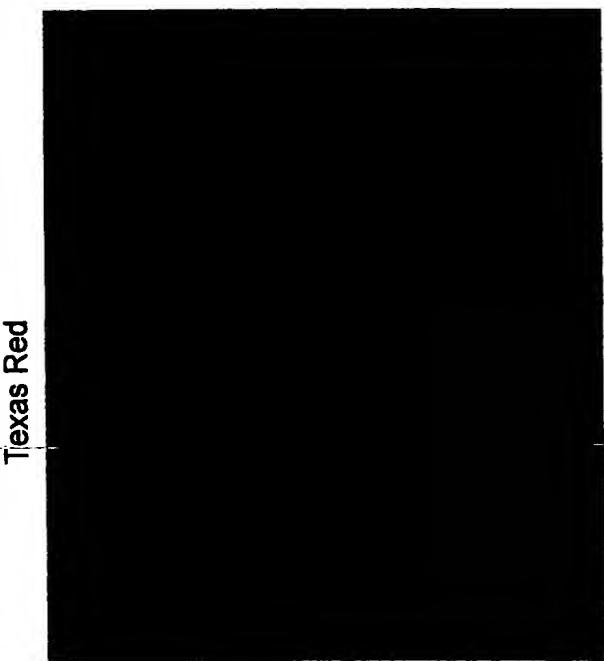
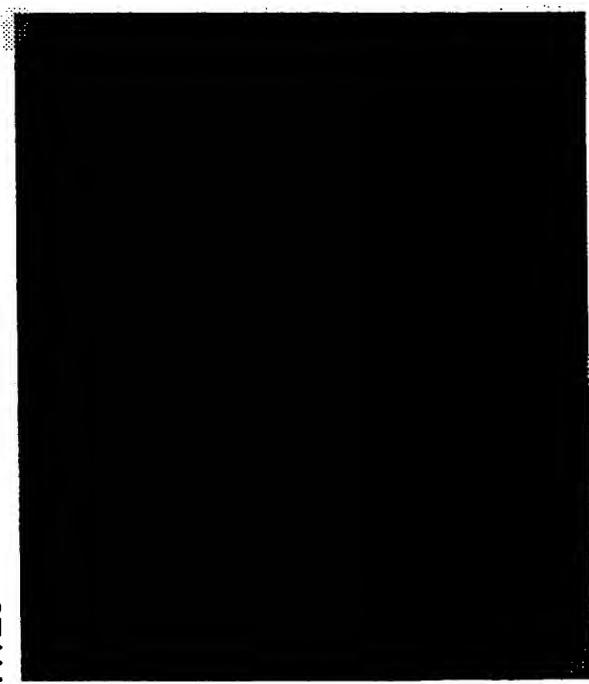
Figure 1

Peptide:SM1738
Lignée:A172



Texas Red

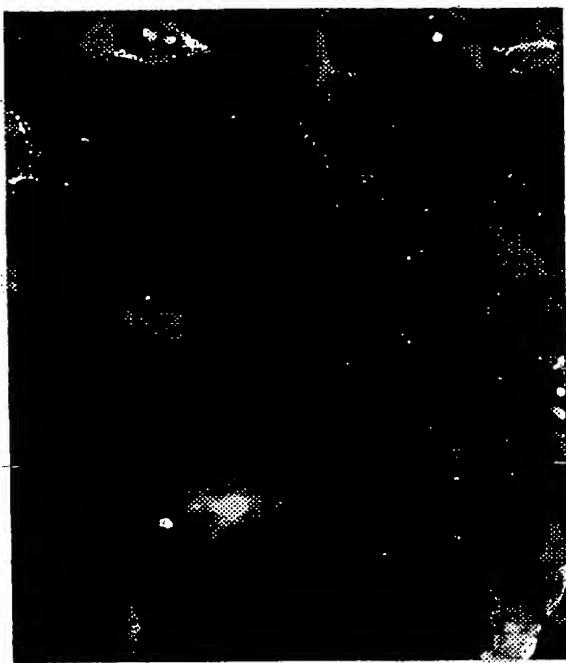
Peptide:SM1738
Lignée :HT29



2/5

Figure 2

Texas Red



P ptide:SM1738
Lignée:HuVec

Hoechst

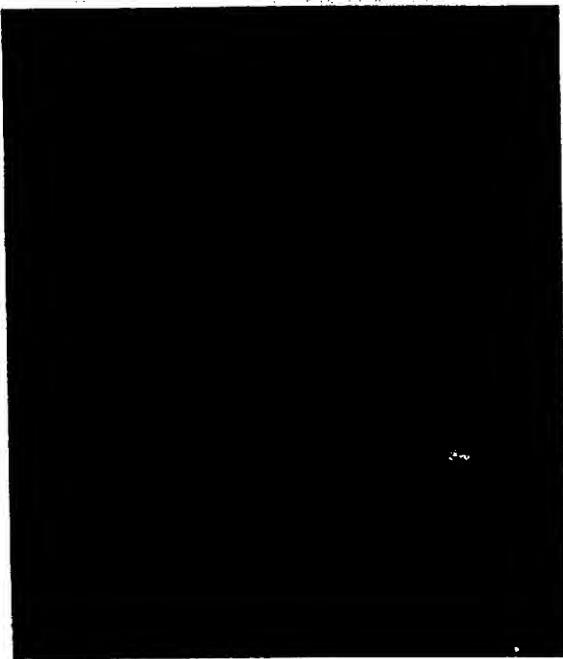


Figure 3

3/5

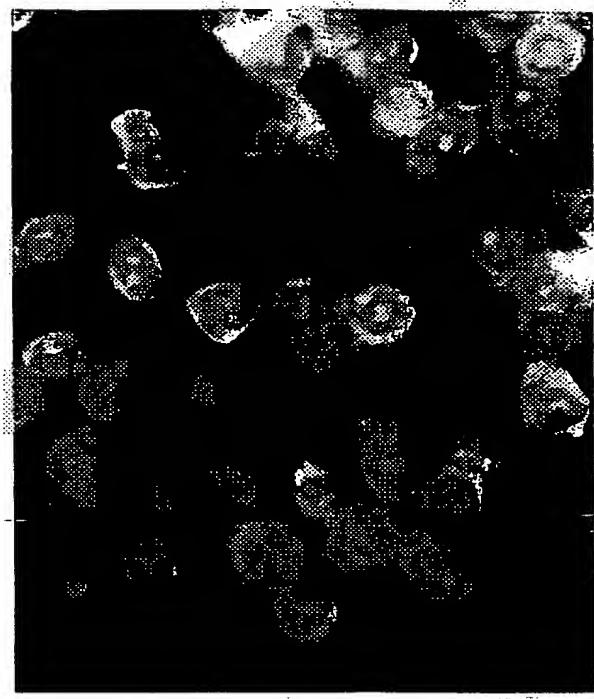
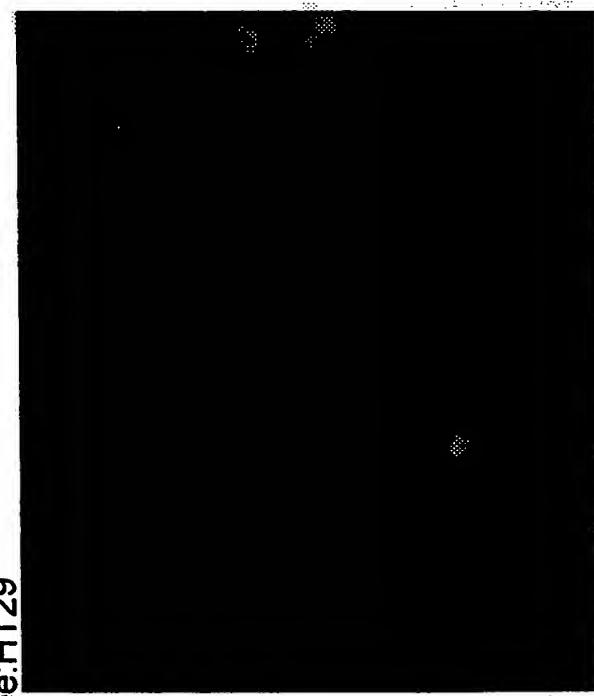
Texas Red



Peptide SM2307
Lignée:A172



Peptide SM2307
Lignée:HT29

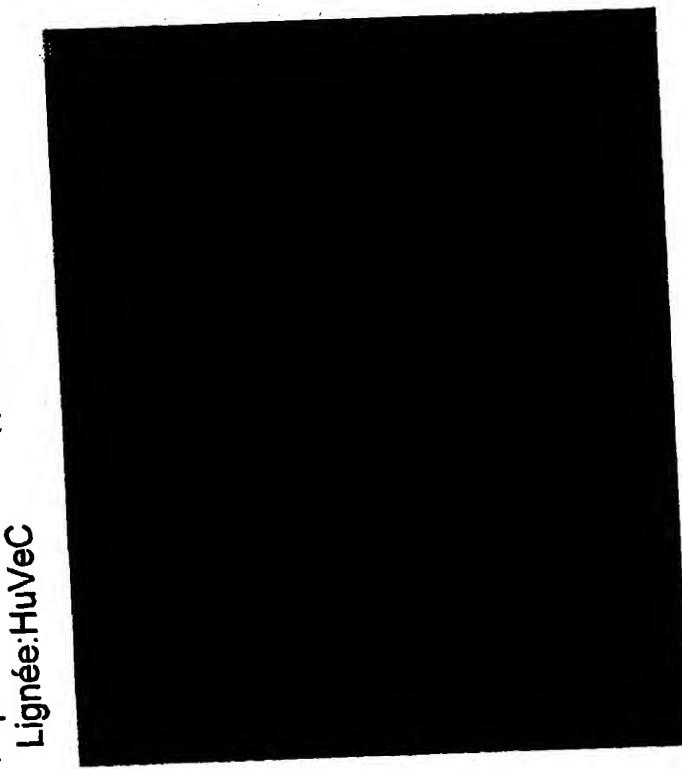


4/5

Figure 4

Peptide SM2307
Lignée: HuVec

Texas Red



5/5

Figure 5

SM1738-dox
10 μ M, 60 min, MCF7

